

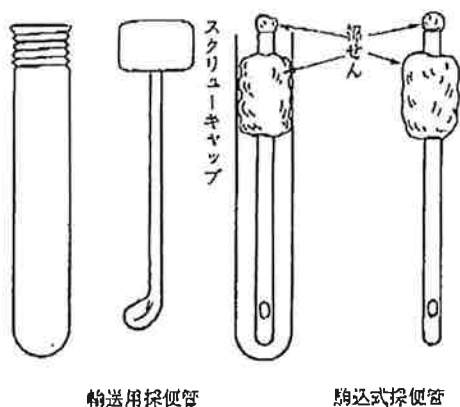


図1 採便管

で、目的に応じて使用するとよい。

4) 検体の一部を試料とする場合は、できるだけ検体を均質に混合する。混合できない検体の場合は、検体の全体を代表することができるように、できるだけ多数の試料を乱数表などを使用して無作為に採取する。

一方、試料採取量は多ければ多いほど精度が上がるというものではない。危険性や経済性も考慮し、できるだけ必要最小限にとどめるべきである。すなわち、試験目的、対象菌の推定菌数や生存性などに応じて決定されるもので、通常、1回の試験操作に必要な量の2~3倍で十分である。参考のために、表Iに一般的な試料中の総生菌数を示した。

5) 5℃以下であれば、腸炎ビブリオなどの低温に弱い菌や逆にエルシニアなどの低温でよく増殖する菌を除き、一般に菌の死滅や増殖は起こらない。凍結保存する場合には、グリセリン(10~50%)などの安定剤を入れて-60℃以下に急速凍結することが望ましい。一般に使われているフリーザー(-20℃程度)での凍結では死滅する菌も多く、好ましくない。また、乾燥した試料などは現場温度(室温)で十分であり、そのほうが適切なこともある。

6) 通常、採取後、48時間以内に試料調製を実施する。

7) 腸炎ビブリオを対象とする場合は、これらの培地や保存液は2% NaCl水溶液を用いて調製する。

表I 一般的な試料中の生菌数

試料名	生菌数*	備考
市販食品		
魚	$10^3 \sim 10^6/g$	新鮮
魚	$10^0 \sim 10^0/g$	腐敗
魚	$10^3 \sim 10^5/cm^2$	鮮魚(表面)
魚	$10^6 \sim 10^9/cm^2$	腐敗(表面)
いか	$10^2 \sim 10^6/g$	新鮮
かき	$10^3 \sim 10^6/g$	新鮮
環境試料		
河川水	$10^3 \sim 10^5/ml$	
海水	$10^2 \sim 10^5/ml$	
土壌	$10^5 \sim 10^6/g$	森林土
その他		
ふん便	$10^{11} \sim 10^{12}/g$	健康成人
手指	$10^1 \sim 10^3/cm^2$	
まな板	$10^1 \sim 10^3/cm^2$	

* 1.2.1.2.5) 標準平板菌数に相当する。

8) 試料の調製や試料液の希釈には、しばしば滅菌生理食塩水が用いられるが、滅菌リン酸緩衝食塩水を用いてもよい。なお、河川や海洋などの環境水を試料とする場合は、希釈水として高圧蒸気滅菌またはろ過滅菌した試料水を使用すること多い。また、脂肪分の多い試料の場合はTween 80やTergitol 7などの細菌に毒性のない界面活性剤を添加するとよい。

9) 定量を目的とする場合は正確に一定量を分取したり、一定量にメスアップするなど、定量的に操作する。

10) 菌数計算に際しては、試料の一定面積に付着していた細菌が使用した滅菌希釈水の全量(懸濁に使用した滅菌希釈水の量に綿棒や、ガーゼを湿らすために使用した滅菌希釈水の量を合わせた量)中に懸濁されたとして計算する。ここには最も簡便なふき取り(スワブ)法を示したが、ホモジナイザー法、振とう法、超音波法、ミキサー法、ストマッガー法、ポンプ循環法、真空ブローブ法、増地スタンプ法、増地噴霧法、増地浸漬法などが考案されているので、試験目的や試料の種類などに応じて、適当なものを選択するとよい。たとえば、土壌などの粒状試料の場合はその一定量をそのまま一定量の滅菌希釈水に振とう懸濁し、その上清を試料液とする。この際、懸濁条件を変化させることにより、土壌粒子の表面か細孔内部に存在したかなどの区別が試みられている。

文献

- 1) 好井久雄, 金子安之, 山口和夫編: 食品微生物ハンドブック, 技報堂出版(1995)

3) 菌数測定¹⁾

【注解】

1) 試料中に存在する細菌(生菌)数を測定する方法としては、試料を適当な条件下で培養して計数する間接法と、試料を直接顕微鏡下で観察して計数する直接法とがある。

間接法の代表的なものは混釈平板培養法、塗抹平板培養法および最確数法である。これらはある一定の条件下(培養温度、培地の栄養成分、好気あるいは嫌気培養、培養時間、培地のpHなど)で培養すると、細菌が発育して寒天培地上にコロニー(集落)を形成したり、液体培地が混濁したりすることを利用して計数するものである。これらは培養条件を適当に選ぶことにより、特定の性質を持った細菌の数を測定できる受所があるが、あらゆる細菌を増殖させるような培養条件はみつからないので、必ずしも試料中に生存するすべての細菌の数を表すものではない。特に前二者では、一つのコロニーは1個の細胞が分裂してつくられるという仮定に立っているため、試料中の細菌が菌塊を形成していたり、連鎖を形成していたり、2個以上の菌体が偶然同一点に分布していたならば、結果的には1個の集落として表現される場合がある。したがって、試料調製の際には十分混濁するよう注意が必要である。メンブランフィルター法は試料中に存在する菌数が微量であるとき、あるいは寒天分解菌など寒天培地を利用できないときに用いられる方法である。なお、特定の細菌群のみを計数する際には、通常選択培地で特定の培養条件で実施され、形成コロニー数だけでなく、コロニーやその周辺部の性状から、ときには、コロニー形成後に特異的な色素や抗体、DNAブローブなどと反応させることにより、その菌群を特定し、計数することもある。

直接計数法では、特異的に細菌を染色する方法が重要である。この代表的なものは、タンパク質や核酸を蛍光色素で染色して落射蛍光顕微鏡で観察する全菌数の計測法〔(1.2.1.2.9)〕であり、環境水中には間接法によって計数できない細菌類が多数

を占めるという事実から、近年、環境水試料の細菌学的試験によく使用されるようになってきた。

なお、ムラミン酸、ATP、クロロフィル、核酸、タンパク質などの菌体成分を化学的あるいは免疫学的に定量的に、酸素吸収量や炭酸ガスの発生量など細菌の持つ活性を測定し、菌数相当量として測定する方法も行われており、対象とする細菌や試料、あるいは実験目的によっては有用である。

(1) 混濁平板培養法

試料液と寒天培地とをシャーレ中で混濁凝固させ、培養後発生した集落数から、試料中の生菌数を算出する。

〔試 験〕① 滅菌希釈水：② ② 試料の調製と同じ

〔試験操作〕希釈試料液の調製：② ② 試料の調製に従って調製した試料液を滅菌希釈水を用いて、10 倍段階希釈を行う¹⁾。

寒天平板の調製：試料液または各段階希釈試料液の 1.0 ml を滅菌シャーレ 2～5 枚ずつに入れる。次いで、あらかじめ加温溶解し、約 50℃ に保った²⁾所定の寒天培地 15～20 ml を無菌的に注ぎ、シャーレのふたに付着しないように注意しながら、試料と培地をよく混和したのち、冷却凝固させる³⁾。

培養：平板を上下転倒して培養する。

集落数の算定：培養後ただちに発生した集落数を計数する⁴⁾。集落数の算定は、拡散集落がなく、1 平板に 30～300 個の集落が見られる平板を選んで行う⁵⁾。

菌数計算：得られた 1 平板当たりの集落数(平均値)と、試料採取量および希釈倍数から、試料 1 ml または 1 g 中

の菌数を算出する。

〔注解〕

1) 1 平板当たりの集落数が 30～300 個となるものが得られるように、未知試料の場合はなるべく広い希釈段階について培養を行うべきである。

2) 試料液中に含まれる細菌に傷害を与えないためには、培地の温度はできるだけ低いほうがよい。50℃ という温度は、シャーレの中で試料液と培地の混和操作が完了するまで寒天が固化しないように若干の余裕を持たせた温度である。熱に敏感な細菌を取り扱う場合は、1.2.1.1 3) ② 塗抹平板培養法で行うほうがよい。

3) 拡散集落の発生を抑えるために、この上にさらに溶解した寒天培地を 3～5 ml 重層することもある。なお、この際、試料をシャーレに入れてから培地を注加するまでに 20 分以上を経過してはならない。

4) やむをえない場合には培養後の培地を 5℃ に保存し、24 時間以内に計数する。計数はフェルトペンなどを用いて、シャーレの裏からチェックしながら数えてもよいが、多数の試料について行う場合は、各種の集落計数器(コロニーカウンター)が市販されているので、それを用いると便利である。また、集落が小さい場合はルーペや実体顕微鏡を用いるとよい。

5) 平板の周縁部、表面、あるいはシャーレと培養基との間の水分に沿って拡散した集落が発生したり、また培養基と試料とを混合する際、菌塊が分離して互いに接触し、密着した集落となり、それらのために同一場所に発生した他の集落の計測に支障をきたすことがある。これらの場合を拡散集落という。

また、集落数が多すぎるときには、一定面積に発生した集落を計数し、これによって全集落数を算出することも行われるが、正確な値は期待できない。

表 I 寒天平板培養法における細菌数測定の例

試料番号	各希釈の集落数		集落数の比 ^{a)}	採用した細菌数	参考規約項目
	1 : 100	1 : 1000			
1001	234	24 ^{b)}	—	23000	i
1002	293	42	1.4	36000	ii (a)
1003	140	32 ^{b)}	2.8	14000	ii (b)
1004	拡散集落 ^{c)}	36	—	36000	iii
1005	1234 ^{b)}	拡散集落 ^{c)}	—	>120000	iii, iv
1006	1234 ^{b)}	333 ^{b)}	—	>200000	iv
1007	22 ^{b)}	1 ^{b)}	—	<3000	v
1008	0 ^{b)}	0 ^{b)}	—	L.A. ^{d)}	vi
1009	拡散集落 ^{c)}	5 ^{b)}	—	L.A. ^{d)}	iii, vi
1010	45 ^{b)}	55 ^{b)}	—	L.A. ^{d)}	vi
2001 ^{e)}	375 ^{b)} 408 ^{b)}	40 36	—	38000	i
2002 ^{e)}	312 285	23 ^{b)} 27 ^{b)}	—	30000	i
2003 ^{e)}	296 378 ^{b)}	32 24 ^{b)}	1.1	21000	ii (a)
2004 ^{e)}	138 162	42 ^{b)} 30 ^{b)}	2.4	15000	ii (b)
2005 ^{e)}	274 230	35 拡散集落 ^{c)}	1.4	30000	ii (a), iii

a) 2 希釈段階の集落数を試料同量中の数値に換算したときの比

b) 採用しなかった集落数

c) 拡散集落が 1 平板の 1/2 以上を占めた場合

d) Laboratory accident (試験室内事故) の場合

e) 1 希釈段階につき、2 枚以上の平板を計数した場合

本法による菌数測定は以下に示す規約項目に準じ、表Ⅰに示す計算例を参考にして求めるとよい。

規約項目：

i) 拡散集落がなく、30～300個の集落が発生した場合：各平板の集落数から、全集落数を計数し、記録する。1希釈段階につき複数の平板を計数した場合はそれらの算術平均を求める。通常1希釈段階にのみに30～300個の集落数が得られるはずであるので、得られた集落数にその希釈倍数を乗じて試料中の菌数とする(No.1001, 2001, 2002)。

ii) 連続した希釈段階に、30～300個の範囲の集落が得られた場合：各希釈段階ごとの集落数に、その希釈倍数を乗じて細菌数を算出したのち、その比に応じて次の方法で細菌数を計算する。

(a) 二つの希釈段階の細菌数の比が2以下のときは、二つの希釈の各細菌数の算術平均をとる(No.1002, 2003, 2005)。

(b) 二つの希釈段階の細菌数の比が2以上のときは、細菌数の少ないほうのみをとり記載する(No.1003, 2004)。

iii) 拡散集落がある場合：選り出した平板に拡散集落が発生していた場合には、以下の条件のものに限り、それ相当の部分を選定して算出する。これ以外は拡散集落(Spreader)と記載する(No.1004, 1005, 1009, 2005)。

(a) 平板の拡散集落以外の集落がよく分散しており、拡散集落があっても測定に支障がないもの。

(b) 拡散集落が覆っている部分が、平板の1/2以下のもの。

iv) 全平板に300個以上の集落が発生した場合：30～300個の範囲内の平板が得られず、すべてがそれ以上であるならば、何個以上と表記する。たとえば1000倍希釈では、1ml中の細菌数300000以上(>300000)と記載する(No.1006)。なお、300に最も近い平板を用いて算出することもあるが、あくまでも参考値である。No.1006では330000となる。

v) 全平板に30個以下の集落が発生した場合：すべての平板に30個以下の集落しか得られなかった場合はiii)およびvi)の項に該当しなければ、最も希釈倍数の低いものを計数して何個以下と表記する。たとえば100倍の希釈では、1ml中の細菌数3000以下(<3000)と記載する(No.1007)。

vi) 試験室内事故(laboratory accident; L.A.)：以下のような結果を得た場合は、その防止処置を講じて再試験を実施する。再試験を実施できない場合はすべて試験室内事故(L.A.)として報告する(No.1008, 1009, 1010)。

(a) 集落の発生がなかった場合(No.1008)。ただし、滅菌状態を確かめる無菌試験などの場合は別である。

(b) 拡散集落が平板の1/2以上を占めている場合

(c) 汚染されたことが明らかな場合(たとえばNo.1010のように希釈倍数が低い平板のほうが集落数が大きく、試験操作過程での汚染と判断されるような場合)

(d) その他、不適当と思われる場合(たとえば、No.1009のような場合)

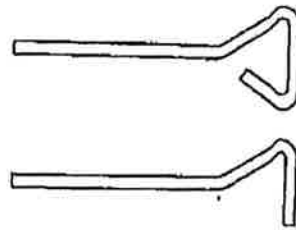
(2) 塗抹平板培養法)

試料液を寒天平板培地上に塗抹し、培養後発生した集落数から、試料中の生菌数を算出する。

【試薬】① 滅菌希釈水：2) (2) 試料の調製に同じ

【試験操作】希釈試料液の調製：2) (2) 試料の調製に従って調製した試料液を滅菌希釈水を用いて、10倍段階希釈を行う。

寒天平板の調製：加温溶解した所定の寒天培地15～20



図Ⅰ
コンラージ棒

mlを滅菌シャーレに注ぎ、冷却固化させる。

試料液の塗抹²⁾：寒天平板2～5枚に、試料液または各段階希釈試料液の0.1mlを滅菌ピペットを用いて平板の中央に注加し、滅菌コンラージ棒などで、平板全面に均等に塗抹する³⁾。

培養：1～2時間そのまま静置して培地表面を乾燥させたのち、平板を上下転倒して培養する。

集落数の算定：培養後ただちに発生した集落数を計算する。集落数の算定は、拡散集落がなく、1平板に30～300個の集落が見られる平板を選んで行う⁵⁾。

菌数計算：得られた1平板当たりの集落数(平均値)と、試料採取量および希釈倍数から、試料1mlまたは1g中の菌数を算出する。

【注解】

1) 標準平板菌数(一般細菌数)の測定をはじめとして混濁平板培養法を用いるものにはすべて、塗抹平板培養法も用いる。従属栄養細菌や低温細菌は温度に対して感受性のものが多いので、塗抹平板培養法のほうがよい。また、塗抹平板培養法の場合は、集落が寒天培地の表面に形成されるので、集落の形状の観察や釣菌が容易である。なお、寒天平板は、作成後長期保存すると水分が蒸発して、集落の形成が難しくなる。一般には平板表面の適度な乾燥と作成時の無菌操作の確認のため、30～37℃で一晩保存したものを使用すると良い結果が得られる。

2) 近年、迅速、簡易、省力化を目的として、いくつかの自動測定装置が開発され、市販されている。

3) 塗抹棒ともいい、図Ⅰのように径2～3mmのガラス棒の先端を一辺約2～5cmの三角形に細工する(L字棒でもよい)。使用前に必要な本数のものを適当な容器の中に並べて滅菌しておいてもよいが、使用前に70%アルコール溶液に先端を浸しておき、使用時に火炎により火をつけてアルコールを除くことにより滅菌してもよい。なお、プラスチック製の滅菌済市販品もある。

(3) 最確数(MPN)法

10倍段階希釈した連続する数段階の試料液(たとえば10, 1および0.1ml)をそれぞれ数本の適当な液体培地(試験管)に接種して所定の条件で培養し、増殖または所定の反応が認められた試験管数から試料中の細菌数(生菌数)を最確数(MPN)¹⁾として算出する。

【試薬】① 滅菌希釈水：2) (2) 試料の調製に同じ

【試験操作】希釈試料液の調製：2) (2) 試料の調製に従って調製した試料液を、滅菌希釈水を用いて10倍段階希釈を行う。

培養：試料液または希釈試料液10, 1および0.1mlを所定の液体培地10mlの入った試験管3本または5本、無菌的に接種し、培養する。ただし、試料10mlを